



Correlação de metodologias de quantificação de proteínas em leucócitos no diagnóstico de doenças lisossômicas de depósito

Eduarda Tassoni Käfer, Janice Carneiro Coelho

Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo - Doenças Lisossômicas de Depósito (LEIM-DLD), Laboratório 25- Departamento de Bioquímica do ICBS- UFRGS.

duda_kafer@hotmail.com

Introdução

A quantificação de proteínas é utilizada em nosso laboratório para expressar a atividade enzimática no diagnóstico de doenças lisossômicas de depósito em amostras de leucócitos. Esse grupo de doenças são erros inatos do metabolismo caracterizados bioquimicamente por deficiência enzimática.

Objetivo

O objetivo desse trabalho foi correlacionar três diferentes métodos de dosagem de proteínas para a identificação do método mais adequado para expressão de atividades enzimáticas em amostras de leucócitos.

Materiais e métodos

Foram obtidos 10 mL de sangue com anticoagulante heparina de 34 indivíduos. Os leucócitos foram separados das amostras segundo a técnica de Skoog e Beck (1956), diluídos em água destilada e sonicados para a lise das membranas celulares. Foram realizadas dosagens das proteínas presentes nas amostras em três técnicas colorimétricas em placas de 96 poços: 1) técnica descrita por Lowry et al. (1951), que utiliza reagente cúprico e reagente de Folin, 2) técnica descrita por Bradford et al. (1976), que utiliza Coomassie Plus™ e 3) técnica de Pierce™-BCA (Smith et al., 1985), que utiliza ácido biocrônico. O resultado das três técnicas foi correlacionado utilizando-se teste de Correlação de Pearson considerando $p < 0,05$, e analisados com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.03.

Conclusão

A quantificação de proteínas totais é necessária para a correção da atividade enzimática pelo tempo de incubação com o substrato da reação e o volume de amostra nas técnicas de diagnóstico de doenças lisossômicas de depósito. O resultado das três correlações foi significativamente positivo, demonstrando que os três métodos podem ser utilizados na expressão das atividades enzimáticas. Devido à facilidade do método de Bradford, que utiliza apenas um reagente, bem como a menor quantidade de amostra necessária e tempo de análise, este será o método definido para uso por nosso grupo de pesquisa no laboratório.

Resultados

As técnicas de Bradford e Lowry utilizam 10uL de amostra de leucócito e a BCA 25uL. Lowry necessita de 40 minutos de incubação, Bradford de 10 min e BCA de 30min quando realizadas em placas de 96 poços. Os resultados das análises de correlação de Pearson foram: Lowry x Bradford $r=0,7289$ (figura1), Lowry x BCA $r=0,8532$ (figura 2) e Bradford x BCA $r=0,8223$ (figura 3), sendo $p < 0,001$ para as três correlações.

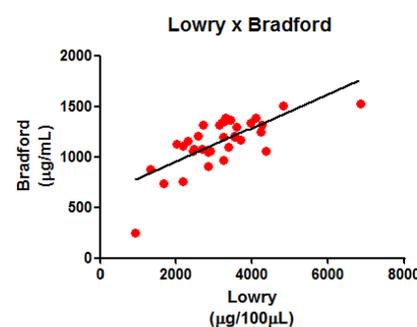


Figura 1: Correlação técnica de dosagem de proteínas: método de Lowry x método Bradford. $r=0,7289$ ($p < 0,001$).

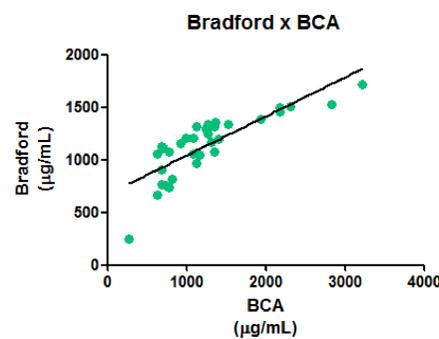


Figura 2: Correlação técnica de dosagem de proteínas: método Bradford x método de BCA. $r=0,8532$ ($p < 0,001$).

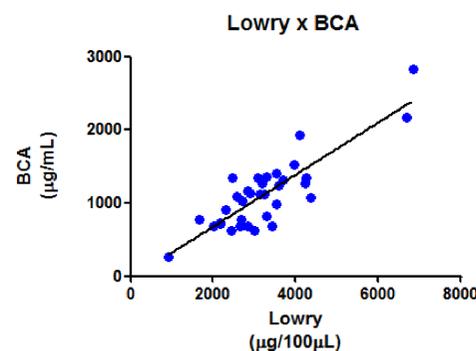


Figura 3: Correlação técnica de dosagem de proteínas: método de Lowry x método BCA. $r=0,8223$ ($p < 0,001$).